

Afd. Diergeneesmiddelen 1984-09-10
RAPPORT 84.85 Pr.nr. 505.0600
Onderwerp: Oriënterend onderzoek verge-
lijking Nitrovin-analyse in voeders
volgens RIKILT methode en Orphahell-
methode.
Bijlagen: 3.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. Diergenees-
middelen (4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme),
Projektbeheer, Projektleider (Aerts).

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van dier-
geneesmiddelen op niet microbiologische wijze.

Onderwerp: Oriënterend onderzoek vergelijking Nitrovin-analyse in
voeders volgens RIKILT-methode en Orphahell-methode.

Bijlagen: 3

Doel:

Vergelijken van de Nitrovin HPLC-methode ontwikkeld door Orphahell
B.V. met de RIKILT-methode. Met name oriënterend kijken naar
extractieverschillen tussen gepelleteerde voeders en meel.

Samenvatting:


Drie braadkuikenvoeders zijn geanalyseerd volgens de beide methoden.
Hierbij bevond zich een meel en het daaruit bereide gepelleteerde
voeder.


Conclusie:


Voorlopig lijkt de Orphahell-methode hogere gehalten Nitrovin op te
leveren voor gepelleteerde voeders. Voor meel werd geen verschil
gevonden.

Tussen meel en daaruit gevormde pellets bestond nog een aanzienlijk
verschil in gehalte.

Verder onderzoek is nodig ter onderbouwing van bovenstaande.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts 

Medewerkers/Samenstellers: H.A. Roozendaal, drs M.M.L. Aerts  .

Projectleider: drs M.M.L. Aerts  ,

Inleiding:

Nitrovin is een groeibevorderaar voor pluimvee, kalveren en varkens. Het wordt in gehalten van 10-40 ppm als additief aan voeder toegevoegd.

Nitrovin lijkt een niet erg stabiele stof (in 4 maanden ongeveer 25% achteruitgang). De analyse vindt veelal plaats via spectroscopie of vloeistofchromatografie (HPLC). Tijdens het pelleteren kan Nitrovin ingesloten worden en/of ontleden door met name de hoge temperatuur. In het laatste geval wordt vanzelfsprekend minder Nitrovin gevonden in pellets dan in meel. In het eerste geval is het zaak de extractiemethode zodanig te maken dat 100% recovery optreedt. Hierdoor wordt het juiste gehalte gevonden.

Orphahell heeft een nieuwe extractieprocedure ontwikkeld waarbij geclaimd wordt dat zowel uit meel als pellets 100% recovery plaatsvindt.

Deze methode nu is vergeleken (oriënterend) met de binnen het RIKILT gebruikte methode, op verzoek van Orphahell.

Experimenteel

De RIKILT methode gaat uit van extractie met een mengsel van DMF/MeOH en di-isopropylamine (Bijlage 1). Extractie vindt plaats door mechanisch schudden (30 min kamertemperatuur).

De Orphahell-methode verschilt in het extractiemengsel waaraan water is toegevoegd (DMF; MeOH; NH_3 ; H_2O) en extractie in het ultrasoonbad (Bijlage 2).

Bovendien wordt fijner gemalen dan bij de RIKILT methode ($< 0,75$ mm resp. < 1 mm).

De extractie-opbrengst moet dan hoger zijn door betere ontsluiting van het voeder. De oplosbaarheid van Nitrovin wordt wel verlaagd door de watertoevoeging.

Vanwege een beperkte hoeveelheid monster is bij de Orphahell-methode het gehele voorschrift gehalveerd.

Resultaten:

In tabel I zijn de analyseresultaten van de drie monsters weergegeven. Monsters A en B zijn afkomstig van Orphahell. Monster B is gepelletiseerd kuikenvoer, bereid uit meel A. Beiden hebben een opgegeven gehalte van 18 ppm.

Monster C is een praktijkmonster (pellet, gemalen 1 mm). De 2e serie monsters volgens de Orphahell-methode heeft vanwege apparatuurproblemen een nacht in de koelkast gestaan. Dit betekent dat de waarden alleen onderling vergeleken mogen worden.

Het meel A wordt via beide methoden even hoog gevonden. De pellets B en C daarentegen liggen 20-30% hoger bij de Orphahell procedure. Tussen het meel en de daaruit gevormde pellets zit ook een substantieel verschil in beide methoden ($\approx 15\%$ Orphahell tegen $\approx 45\%$ via RIKILT procedure).

Tabel I

Monster	Orphahell methode		RIKILT-methode
A	19,4 ppm	14,5 ^{a)}	19,4 ppm
B	15,7 ppm	10,5	10,3 ppm
C	6,5 ppm ^{b)}	6,0	5,5 ppm

a) Monsters hebben een nacht in de koelkast gestaan.

b) Triplo bepaling, waarvan één extra geschud met de hand tijdens ultrasoon trillen ($6,5 \pm 0,2$ ppm).

Conclusie:

Voorlopig kan gesteld worden dat via de Orphahell methode een betere ontsluiting c.q. extractie optreedt. Het is evenwel niet zo dat voor meel en pellets hetzelfde gehalte gevonden wordt. De RIKILT-methode voldoet goed voor meelmonsters. Verder onderzoek aan grotere meel- en daaruit gemaakte pelletmonsters is noodzakelijk voor een goed onderbouwde vergelijking.

Bijlage 1: RIKILT Intern Analysevoorschrift nr. A 154, 1e oplage (1983-07-07).

Bijlage 2: Orphahell B.V. Verbeterde bepalingsmethode voor Nitrovin in gepelletiseerde- en meelvoeders.

Bijlage 3: Chromatogrammen van standaard- en pelletmonster Orphahell B.V.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM 34
1e oplage (1983-07-07)

Bepaling van nitrovin (HPLC-methode)

1. Doel en toepassingsgebied

De methode is geschikt voor de bepaling van nitrovin in mengvoeders.
De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 3 mg/kg.
Het terugvindingspercentage bedraagt meer dan 95%.

2. Principe

Nitrovin wordt uit het voer geëxtraheerd met een dimethylformamide-methanol-di-isopropylamine mengsel.
Na filtratie wordt een deel van het extrakt geïnjecteerd op een "reversed phase" hogedrukvlloeistofchromatografiekolom en het gehalte wordt kwantitatief bepaald m.b.v. een UV-detektie bij 546 nm.

3. Reagentia

3.1 N.N-Dimethylformamide "zur Synthese" (b.v. Merck art. 822275).

3.2 Methanol p.a. (b.v. Merck art. 6009).

3.3 Di-isopropylamine "zur Synthese" (b.v. Merck art. 803646).

3.4 Millipore water.

3.5 Extraktiemiddel.

Meng 900 ml N.N.-dimethylformamide (3.1) met 100 ml methanol (3.2) en 1 ml di-isopropylamine (3.3).

3.6 Eluens.

Meng 1000 ml extraktiemiddel (3.5) met 500 ml millipore water (3.4) en zet dit gedurende 10 min in een ultrasoonbad.

3.7 Nitrovinstandaard.

3.7.1 Standaardstamoplossing.

Weeg ca. 20 mg nitrovin (3.7) nauwkeurig op 0,1 mg af in een maatkolf van 200 ml.

Los op in extraktiemiddel (3.5), vul aan en meng.

3.7.2 Standaardwerkoplossing.

Pipetteer 5,0 ml van de standaardstamoplossing (3.7.1) in een maatkolf van 100 ml, vul aan met extraktiemiddel (3.5) en meng.

Deze oplossing is geschikt om op het HPLC-systeem (4.1) te injecteren. (Deze oplossing is 1 week houdbaar).

4. Apparatuur

4.1 Hogedrukvlloeistofchromatografische apparatuur met als kolommen

voorkolom: Bondapak C18/Corasil 37-50 micron

(3.9 mm I.D. x 20 mm lengte)

Waters art.no. 27248

hoofdkolom: Lichrosorb RP 18 5 micron

(4,6 mm I.D. x 15 cm lengte)

Chrompak art.no. 28810.

Ter voorkoming van verstopping van de hoofdkolom dient een voorkolom-filter gebruikt te worden. Waters art.no. 84560.

4.2 Ultrasoonbad.

4.3 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Uitvoering

Weeg in een erlenmeyer van 200 ml 10 g fijn gemalen monster op 0,1 g nauwkeurig af. Voeg toe 50,0 ml extraktiemiddel (3.5) en sluit af.

Schud mechanisch gedurende 30 min. Filtreer de oplossing door een snellopend filter (GF/A). Maak verdunningen indien men voormengsels en concentraten heeft zodat men uiteindelijk een concentratie krijgt van 0,1 mg/50 ml.

De concentratie van nitrovin mag niet meer dan 2 µg/20 µl bedragen.

6. Hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC)

eluens : 900 ml N.N.-dimethylformamide met 100 ml methanol en
1 ml di-isopropylamine mengen met 500 ml millipore water
injektievolumme : 20 µl
eluenssnelheid : 1,5 ml/min
golflengte : 546 nm
gevoeligheid : 0,005 Aufs
recorder : 10 mV
papiersnelheid : 10 mm/min.

7. Berekening

Het gehalte in het monster aan nitrovin wordt berekend aan de hand van de volgende formule:

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} \times \frac{E}{F} \times G = \text{mg/kg nitrovin}$$

A = oppervlakte van de nitrovinpiek verkregen met de monsteroplossing
B = oppervlakte van de nitrovinpiek verkregen met de standaardoplossing
C = aantal µg standaard ingewogen
D = verdunningsfaktor standaard
E = verdunningsfaktor monster
F = aantal g monster ingewogen
G = zuiverheid standaard uitgedrukt in decimale faktor.

8. Opmerkingen

Het maximale toelaatbare injectievolumme is 30 µl.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer



Samensteller/medewerker: Y.J.M. van Hemert-de Boer, M.A. Visser-Meijer



verbeterde bepalingsmethode voor nitrovin in gepelletiseerde- en meelvoeders.

30g fijn gemalen monster (bijv. via kruisslagmolen met zeef 0.75 mm)
in ultrasoon bad.

Toevoegen 90 ml extractievloeistof van de volgende samenstelling:

dimethylformamide 564 ml .

methanol 30 ml

ammonia 25% 12 ml

gedestilleerd water 300 ml *Vanwege ontsteking 1/4 voeder.*

Extraheer gedurende 30 minuten.

Laat vervolgens gedurende 10 minuten bezinken.

Filtreer door een glasvezel/koolstof-filter m.b.v. een Büchner trechter.

Bereid nitrovin-standaardoplossingen op dezelfde wijze als hierboven beschreven
(met uitzondering van de filtratie-stap)

Voer de HPLC-bepaling van het nitrovin-gehalte van het monster onmiddellijk uit
na de extractie en filtratie.

HPLC-condities:

Kolom: RP₁₈ 5 micron 'Merck' (of equivalent)

Eluens: dimethylformamide:acetonitril: H₂SO₄ 0.45N
25 : 20 : 57 (V/V)

Flow: 1ml/min

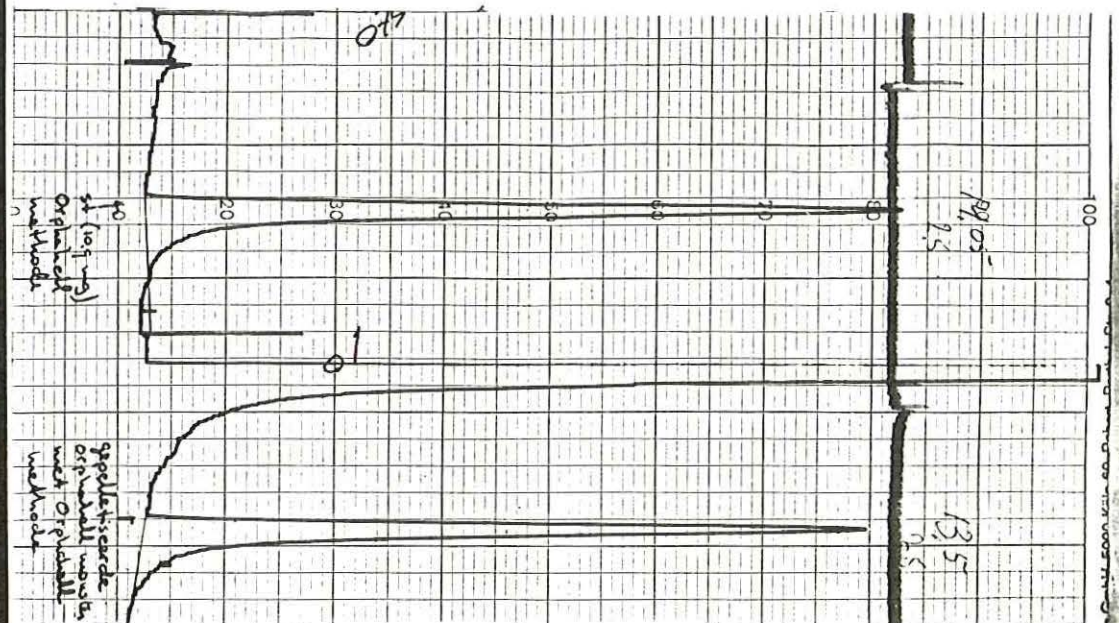
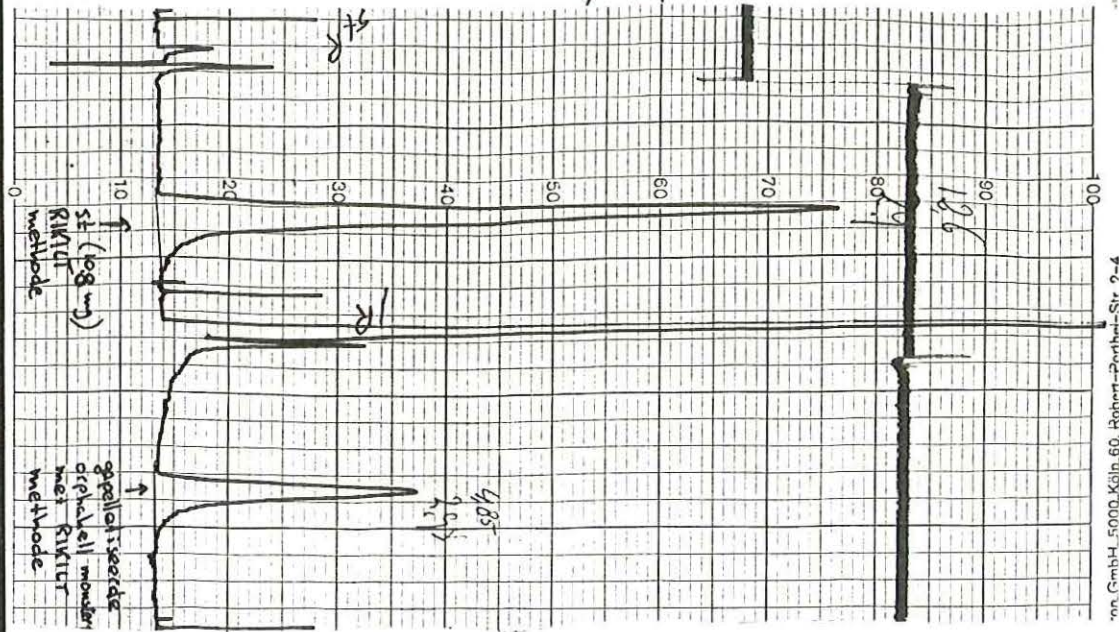
Injectievolume: 20 microliter

Detector: 8 microliter

Detectiegolflengte: 375 nm

Retentietijd nitrovin: ca. 20 min

Bijlage 3.



Verduunningen van
de beide standaarden
waren gelijk

invoeg monster
RIKILT methode
10 gram / 50 ml

invoeg monster
Orphenal methode
15 gram / 45 ml.